

SZENT ISTVÁN EGYETEM

**Az StubSNF1 protein-kináz komplex és a trehalóz-6-foszfát-szintáz hatása a
burgonya termőképességére és szárazságtűrésére**

Doktori értekezés tézisei

Antal Ferenc

Gödöllő

2012

A doktori iskola

- megnevezése:** Növénytudományi Doktori Iskola
- vezetője:** Dr. Heszky László
egyetemi tanár, az MTA rendes tagja
Szent István Egyetem,
Mezőgazdasági és Környezettudományi Kar,
Genetika és Biotechnológiai Intézet
- tudományterület:** 4. Agrártudományok
- tudományága:** 4.1. Növénytermesztési és kertészeti tudományok
- Témavezető:** Dr. Bánfalvi Zsófia
tudományos tanácsadó, az MTA doktora
Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont

.....
Az iskolavezető jóváhagyása

.....
A témavezető jóváhagyása

A munka előzményei, a kitűzött célok

A növények növekedési ütemét és végleges méretét genetikai adottságaik és a környezeti tényezők egyaránt befolyásolják. Ma már igen sok növekedést elősegítő és gátló faktort ismerünk, melyeket elsősorban a modell növényben, *Arabidopsis thaliana*-ban, azonosítottak. Ezek egyike, a trehalóz (α,α -1,1-diglükóz), a növekedést gátló faktorok közé tartozik. A kiszáradástűrő növényekben ozmotikus/szárazságstressz hatására a trehalóz felhalmozódik, és azáltal segíti a sejtek túlélését, hogy stabilizálja a fehérjéket és a membránokat. Ezzel szemben a magasabbrendű növényekben a trehalóz szinte detektálhatatlan mennyiségben van csupán jelen. A trehalóz szintézis molekuláris biológiai eszközökkel elért fokozása számtalan esetben eredményezett szárazságtűrő növényeket több növényfaj esetében is. Ezek a növények azonban legtöbbször törpe fenotípusúak voltak és csak elenyésző mennyiségben tartalmaztak trehalózt, ami arra utal, hogy ezekben a növényekben a szárazságtűrés javulása nem a trehalóz ozmoprotektáns funkciójára vezethető vissza (FERNANDEZ et al., 2010).

Számos bizonyíték utal arra, hogy a trehalóz bioszintézis köztes termékeként szereplő trehalóz-6-foszfát jelmolekulaként több anyagcsere- és fejlődési folyamat szabályozásában is részt vesz. A trehalóz-6-foszfát egyik célpontját az SnRK1 (sucrose nonfermenting-related kinase-1) fehérjék képezik, melyekre a trehalóz-6-foszfát gátló hatást fejt ki (ZHANG et al., 2009; MARTINEZ-BARAJAS et al., 2011; DELATTE et al., 2011).

Az SnRK1 fehérjék - melyek nevüket az élesztőben megtalálható homológ SNF1 (sucrose nonfermenting-1) kinázokról kapták – a stresszválaszok és a cukor metabolizmus központi szabályozó molekulái növényekben. Az SNF1 és a vele rokon SnRK1 (SNF1-related kinase 1) család tagjai többnyire három alegységből álló komplex formájában látják el feladatukat. Élesztőben a katalitikus alegység maga az SNF1 kináz, melynek aktiválását az SNF4 fehérje végzi. A két alegység különböző regulátor fehérjékkel működhet együtt (SIP1, SIP2, GAL83) melyek részt vesznek a komplex sejten belüli lokalizációjának és szubsztrátspecifitásának meghatározásában (HEDBACKER és CARLSON, 2008). Az élesztő GAL83 fehérjének számos ortológját azonosították már növényekben, többek között *Arabidopsis*-ban, paradicsomban és burgonyában is. Az SnRK1 fehérjék transzkripció és poszt-transzkripció szabályozás alatt állnak, foszforiláció útján aktiválódnak és defoszforiláció által inaktíválódnak. A defoszforiláció alacsony AMP-koncentráció esetén gátolt. Az SnRK1 molekulákkal igen sok, különböző

típusú fehérje léphet kapcsolatba, és ezáltal létrejön a szabályozó fehérjék bonyolult hálózata (COELLO et al., 2011).

A burgonya genomában eddig két SnRK1 gént azonosítottak: a *PKIN1*-et és az *StubSNF1*-et (MAN et al., 1997; LAKATOS és BÁNFALVI, 1997). A két fehérje szekvenciája 72%-ban hasonló. Korábban kimutattuk, hogy az *StubSNF1* kináz kölcsönhatásba lép az élesztő GAL83 burgonyában található ortológ fehérjéjével, az *StubGAL83*-mal (LAKATOS et al., 1999). Emellett képes helyreállítani a *Δsnf1* mutáns élesztő fenotípusát is (LOVAS et al., 2003a). A *PKIN1* ezek egyikére sem képes, ami arra utal, hogy a két burgonya SnRK1 funkciója eltérő. Kimutattuk, hogy az *StubGAL83* antiszensz gátlása a gyökérfejlődés késését okozza és fokozott sóérzékenységhez vezet *in vitro* körülmények között. Az antiszensz *StubGAL83* vonalak gumóképzése szintén késedelmet szenved, amit az átlagos gumóméret csökkenése és a gumók darabszámának növekedése kísér (LOVAS et al., 2003b).

Az irodalmi adatok és korábbi eredményeink alapján kísérleteink célja a következő volt: (1) Az *StubSNF1* komplex funkcionális analízisének folytatása olyan növények vizsgálatával, melyekben az *StubSNF1* kináz működése gátolt, illetve olyan növények létrehozásával, melyekben az *StubSNF1* kináz és az *StubGAL83* alegység egyaránt gátlás alatt áll. (2) Az élesztő eredetű trehalóz-6-foszfát-szintáz (*TPS1*) gén működése és az *StubSNF1* kináz közötti kapcsolat megismerése olyan *TPS1* gént kifejező burgonyavonalak vizsgálatával, melyekben vagy az *StubSNF1* kinázt, vagy pedig az *StubGAL83* alegységet gátoltuk.

Anyag és módszer

Növényanyag, nevelési körülmények és sóstressz vizsgálat

Az antiszensz StubGAL83 (aG1, aG5, aG6) és az antiszensz StubSNF1 (aS2, aS5, aS6) vonalakat korábban izoláltuk a burgonya (*Solanum tuberosum* cv. Désirée) transzformációjával (LOVAS et al., 2003b; SÓS-HEGEDŰS et al., 2005). A steril növényeket *in vitro* körülmények között neveltük 24°C-on, hosszúnappalos (16 h fény, 8 h sötét) megvilágítással, 5000 lux fényerő mellett, 2% szacharózt tartalmazó RM táptalajon (MS táptalaj vitaminok nélkül). A transzgénikus növények szelekciójához 50 mg l⁻¹ kanamicint, illetve 9 mg l⁻¹ higromicint alkalmaztunk. Hathetes korú növényeket ültettünk cserepekbe és üvegházi környezetben neveltük őket tovább 18-28°C-on. Burgonyavonalaink sótűrésének vizsgálatához *in vitro* körülmények között fenntartott növényeink szárszegmentjeit 50mM NaCl-ot tartalmazó RM táptalajba szűrtük és naponta regisztráltuk a gyökeret eresztett szárszegmentek számát.

Kétszeresen transzgénikus növények létrehozása

Az élesztő (*Saccharomyces cerevisiae*) *TPS1* génjét pBluescript II KS plazmidből (STILLER et al., 2008) pBINAR-Hyg vektorba építettük (higromicin szelekciót biztosító vektor) a CaMV 35S promóter és az *ocs* terminátor közé. Az *StubSNF1* regulátor doménjét kódoló, 3' helyzetű, 779 bp hosszú szekvenciát antiszensz orientációban építettük be a pBINAR-Hyg plazmidba. A transzgénikus növényeket levéllemez transzformációval hoztuk létre az AGL0 *Agrobacterium tumefaciens* törzs segítségével. A tápközeg 250 mg l⁻¹ cefotaximot tartalmazott az *A. tumefaciens* előlésére, valamint 9 mg l⁻¹ higromicint a transzformánsok kiválasztására.

Northern hibridizáció

A regenerált növényvonalakból a transzgén működésének vizsgálatához össz-RNS-t vontunk ki és formaldehid tartalmú agaróz gélen megfuttattuk. Az elválasztást követően az RNS-t blottoltuk és hibridizáltattuk LOVAS et al. (2003b) útmutatásai alapján. „Random priming” módszerrel ³²P-dCTP-vel jelöltük a teljes hosszúságú *TPS1* cDNS szekvenciát (SAMBROOK et al., 1989). Az *StubSNF1*-specifikus próba előállításához az *StubSNF1* regulátor doménjének 842-1196 bp

közötti szakaszát PCR-rel sokszorosítottuk és a *TPSI*-specifikus próbával azonos módon jelöltük.

Enzimaktivitás mérések

Az SnRK1 fehérjék aktivitásmérését SAMS peptid-szubsztráttal (HMRSSAMSGLHLVKRR) végeztük, BECZNER et al. (2010) szerint. A kivonatok fehérje koncentrációjának meghatározásához BRADFORD (1976) eljárását alkalmaztuk, a standard BSA volt. A nitrát-reduktáz aktivitásának meghatározásához HAGEMAN és HUCKLESBY (1971), valamint HARRIS et al. (2000) módszerét vettük alapul.

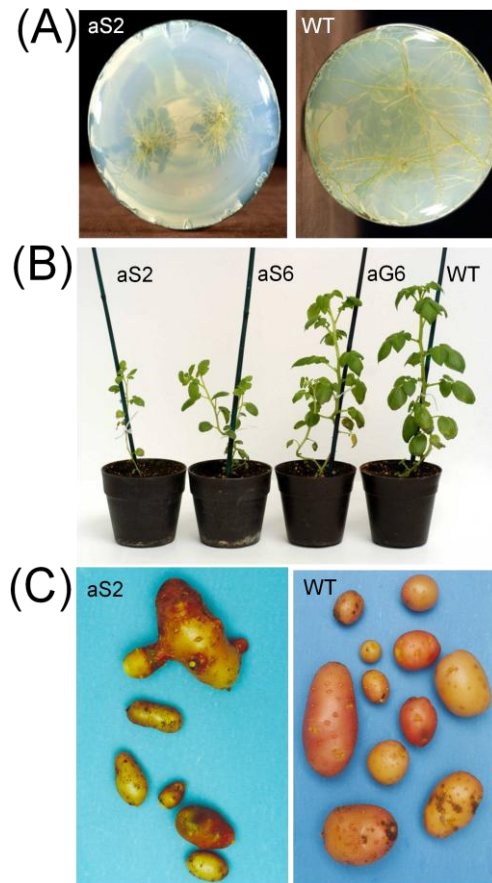
Eredmények

Az antiszensz StubSNF1 vonalak előállítása és jellemzése

Az StubSNF1-gátolt (aS) burgonyavonalakat már korábban izoláltuk. Ezekben a vonalakban az *StubSNF1* regulátor doménjét kódoló szakasz az erős, konstitutív expressziót biztosító CaMV 35S promótorról fejeződik ki antiszensz orientációban (SÓS-HEGEDŰS et al., 2005). Az *StubSNF1* regulátor doménje nukleinsav szinten csupán 65%-ban azonos a *PKINI* azonos doménjével (LOVAS et al., 2003b). BECZNER et al. (2010) kimutatták, hogy az aS vonalakban az antiszensz gátlás specifikus az StubSNF1-re és a kináz aktivitás 30-45%-kal csökkent az *in vitro* növények hajtásaiban.

A korábbi kísérletek folytatásaként három vonalat, az aS2, aS5 és aS6 jelűt, jellemeztük részletesebben. Megállapítottuk, hogy az aS vonalak gyökérfejlődése a vad típushoz képest a legtöbb esetben elmarad. Ez a tulajdonságuk már *in vitro* körülmények között is egyértelműen megmutatkozik és üvegházi környezetben is megmarad. Az aS növények általában kisebbek, mint a vad típusúak és gumóik, mind színükben, mind pedig formájukban, eltérnek a vad típusú gumóktól - sötétebbek és sárgásabbak, valamint jellemző rájuk a „babásodás” is, ami felületi kitéremkedések, azaz másodlagos gumók kialakulását jelenti (1. ábra). Az aS növények gumóhozama 20-30%-al elmarad a vad típusétól.

LOVAS et al. (2003b) azt is kimutatták, hogy az StubSNF1 komplex StubGAL83 alegységének gátlása nemcsak a gyökérfejlődés késéséhez, de fokozott sóérzékenységhez is vezet. Az aS növények vizsgálatával hasonló eredményt kaptunk, de a fenotípusos károsodás mértéke erősebb volt, mint az aG növényeké. *In vitro* körülmények között 50 mM koncentrációjú NaCl jelenlétében a szárszegmentek gyökerezési képessége jelentősen lecsökkent, sőt némely esetben a sóstressz a gyökérképzés teljes gátlásához is vezetett.

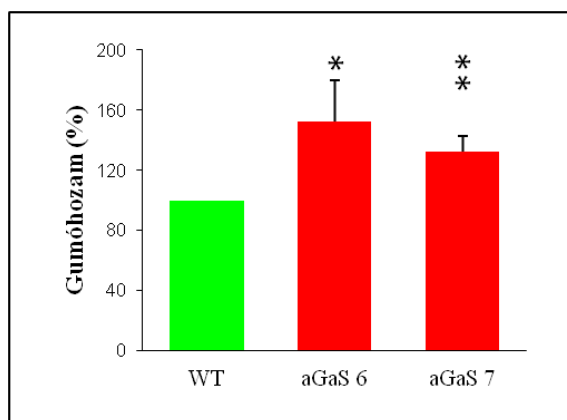


1. ábra. Antiszensz StubSNF1 növények fenotípusa (A) gyökerezés *in vitro* kultúrában, (B) üvegházi növények fenotípusa, (C) üvegházi növények gumói (aS: antiszensz StubSNF1, aG: antiszensz StubGAL83, WT: vad típus)

Az StubGAL83-StubSNF1 kettős antiszensz (aGaS) burgonyavonalak előállítása és jellemzése

Az StubGAL83-StubSNF1 kettős antiszensz burgonyavonalakat az aG6 antiszensz StubGAL83 vonal felültranszformálásával állítottuk elő. Az aG6 vonal létrehozása a kanamicin rezisztenciát kódoló pCP60 vektorral történt (LOVAS et al., 2003b). A kettős antiszensz növények előállításakor az aS növények létrehozásánál is alkalmazott *StubSNF1* szakaszt antiszensz orientációban építettük be a pBINAR-Hyg vektorba és ezzel transzformáltuk az aG6 vonalat. Nyolcvannégy higromicin rezisztens vonalat állítottunk elő ily módon. A vonalak egy része törpe fenotípusú és sárgás levelű volt. Harminchat növényvonal azonban

a vad típushoz hasonló jegyeket mutatott, de voltak közöttük olyanok is, melyek gyorsabban, erőteljesebben fejlődtek a kontroll növényeknél. Ez az *in vitro* kultúrában tapasztalt fenotípus később, üvegházi körülmények között is megmaradt. A harminchat említett vonalat két törpe fenotípusú vonallal együtt üvegházi körülmények közé helyeztük és megvizsgáltuk a gumóhozamukat. Az aG6 vonal termőképessége a kontroll növényekéhez hasonlított. Huszonkét aGaS vonal alacsonyabb-, míg 16 aGaS vonal magasabb gumóhozamot produkált, mint a vad típus. Két magas termőképességű vonalat (aGaS6 és aGaS7) felszaporítottunk és több, nagy egyedszámú kísérlet keretében vizsgáltuk termőképességüket (2. ábra). Az aGaS6 vonal átlagosan 1.7-szeres, míg az aGaS7 vonal 1.2-szeres gumóhozam növekedést ért el a kontroll növényekhez képest.



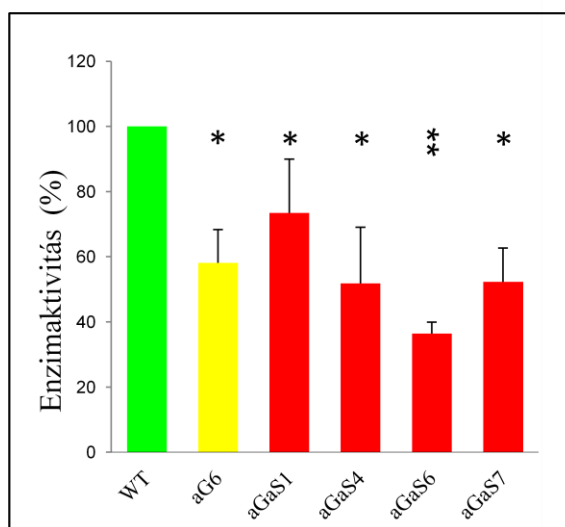
2. ábra StubGAL83-StubSNF1 kettős antiszensz (aGaS) burgonyavonalak gumóhozama (WT: vad típus)

Az aGaS6 és aGaS7 vonalak sótűrő képességét az aS vonalakkal megegyező módon vizsgáltuk meg. Mindkét aGaS vonal még a vad típusú és az aG6-nál is fokozottabb érzékenységgel reagált a só jelenlétére. Két további aG vonalat (aG1 és aG5) is transzformáltunk az antiszensz *StubSNF1* konstrukcióval, hogy megtudjuk, vajon a magasabb termőképességű vonalak létrehozásának képessége az aG6 vonalra korlátozódik-e, vagy más aG vonalak transzformálásával is elérhető hasonló eredmény. Hatvanhárom-, illetve 41 higromicin rezisztens vonalat izoláltunk az aG1 és aG5 vonalak transzformálásával, melyek közül 23 aG1 alapú-, valamint 10 aG5 alapú aGaS vonalnak magasabb volt a gumóhozama, mint a vad típusnak üvegházi körülmények között.

Bár az *StubSNF1* csak alacsony szinten fejeződik ki a vad típusú növények levelében (LAKATOS et al., 1999), az aS vonalokban az *StubSNF1* mRNS szintje

gátlását northern hibridizációval bizonyítani tudtuk (SÓS-HEGEDŰS et al., 2005). Az aGaS vonalak esetében ugyanilyen módon négy alacsony és tíz magas gumóhozamú vonalnál vizsgáltuk meg az *StubSNF1* kifejeződésének mértékét, de egyedül csak az aGaS6 vonalnál tudtunk kimutatni némi csökkenést az *StubSNF1* mRNS szintjében.

A SAMS peptid (HMRSAMSGLHLVKRR) a növényi SnRK1 fehérjék szubsztrátja és széles körben használják az SNF1-aktivitás mérésére. Alkalmazásával BECZNER et al. (2010) 30-45%-os aktivitás csökkenést mért az aS vonalakban. Mi ugyanezzel a módszerrel vizsgáltuk meg antiszensz növényeink SNF1 kináz aktivitását (3. ábra). A vad típushoz képest 42%-os aktivitás csökkenést mértünk az aG6 vonalban, ami arra utalt, hogy az *StubGAL83* az *StubSNF1* pozitív regulátora. Az aG6 vonallal összehasonlítva nem mértünk további jelentős aktivitás csökkenést a vizsgált aGaS vonalakban, kivéve a magas gumóhozamú aGaS6 vonalat, aminek az SNF1 kináz aktivitása mindössze 36%-a volt a vad típusénak.

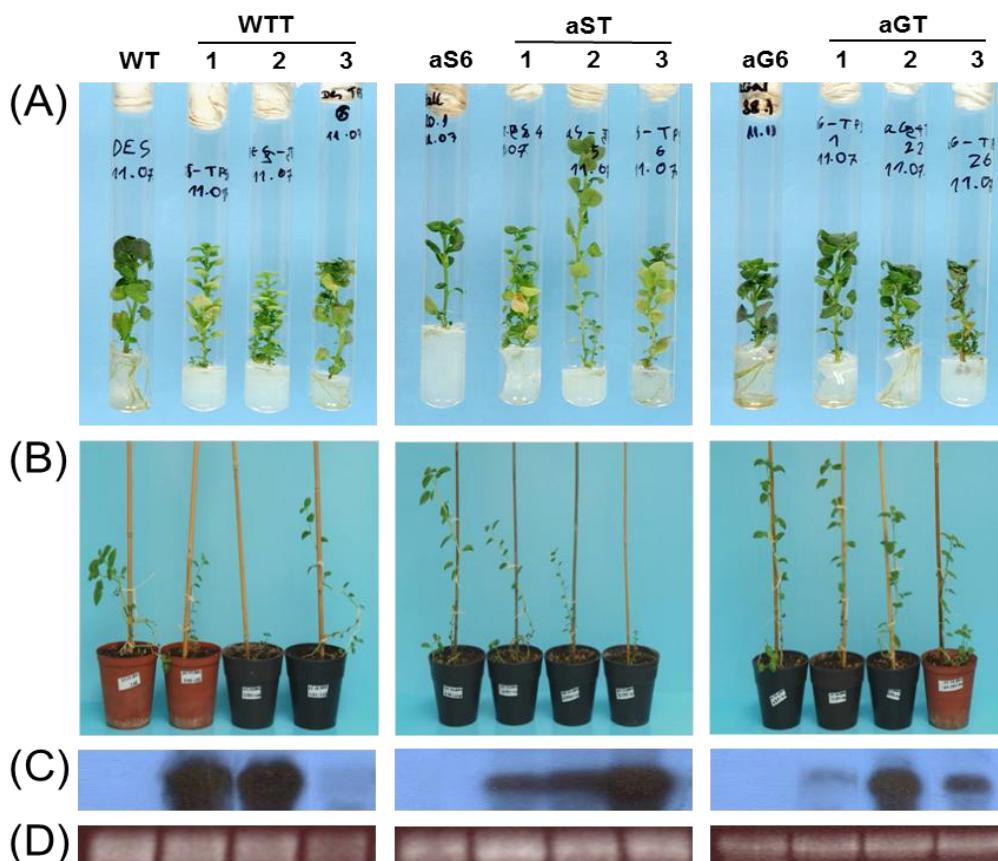


3. ábra. Antiszensz növények SNF1-aktivitása. (aGaS1, aGaS4: kettős antiszensz növények törpe fenotípussal és alacsony gumóhozammal; aGaS6, aGaS7: magas gumóhozamú kettős antiszensz növények; aG6: antiszensz *StubGAL83* vonal; WT: vad típus)

A TPS1 kifejeződésének hatása az StubSNF1-, és StubGAL83-gátolt burgonyanövényekben

Az StubSNF1-gátolt aS6 és az StubGAL83-gátolt aG6 vonalakat felültranszformáltuk az élesztő *TPS1* génjével a higromicin rezisztenciát kódoló pBINAR-Hyg bináris vektor segítségével. A *TPS1* gén folyamatos kifejeződését a burgonyában a CaMV 35S promóterrel biztosítottuk. A transzformáció kontrolljaként vad típusú Désirée növényekbe (WT) is bejuttattuk a *TPS1* gént. Hat WT-TPS1 (WTT), 25 aS6-TPS1 (aST) és 27 aG6-TPS1 (aGT) növényvonalat izoláltunk. A WTT növényvonalakat higromicint tartalmazó táptalajon, míg az aST és az aGT növényvonalakat kanamicint és higromicint egyaránt tartalmazó táptalajon regeneráltattuk. Az így nyert burgonyavonalakat vegetatíván szaporítottuk *in vitro* körülmények között a további kísérletekhez.

A *TPS1* gén kifejeződését northern hibridizációval mutattuk ki, melynél a teljes hosszúságú *TPS1* cDNS-t használtuk a próba elkészítéséhez. RNS molekulákat izoláltunk mind az 58 *TPS1*-transzformáns vonalból, valamint a transzformálatlan kontroll növényekből is. Konstrukciónként 3-3 vonalat választottunk ki részletes vizsgálatra, melyek különböző mértékben fejezték ki a transzgént (4. ábra).



4. ábra. Az élesztő *TPS1* génjét kifejező transzgénikus növények fenotípusa és a transzgén expressziója. (A) *in vitro* növénykultúra, (B) üvegházban nevelt növények, (C) *TPS1* kifejeződés kimutatása northern hibridizációval, (D) RNS-gélkép hibridizáció előtt (WT: vad típus; WTT: *TPS1* kifejező növények; aS6: antiszensz StubSNF1 vonal; aST: *TPS1* kifejező változata az aS6 vonalnak; aG6: antiszensz StubGAL83 vonal; aGT: *TPS1*-kifejező változata az aG6 vonalnak)

A kilenc kiválasztott *TPS1*-kifejező vonalat a kontroll növényeikkel együtt *in vitro* felszaporítottuk. Kimutattuk, hogy a *TPS1* kifejeztetése a vad típusú és az aS6 háttérű növényekben már kis mértékben is súlyos morfológiai aberrációk létrejöttéhez vezet. A WTT és aST vonalak gyökerei visszamaradtak a fejlődésben. A növények hajlamosak voltak a bokrosodásra és a korai öregedés jelei látszottak rajtuk. Ezzel szemben az aGT1 és aGT2 vonal nem mutatott fenotípusos eltérést az aG6 kontroll növényekhez képest. Az aGT3 vonal alsó levelei hamarabb kezdtek sárgulni, mint az aG6 vonal ugyanezen levelei (4. ábra). A kiválasztott növényvonalak fenotípusos sajátosságait üvegházi környezetben is megtartották. A WTT és aST növények nagyon lassan nőttek és csak kevés gumót kötöttek. Az aGT1 és aGT2 vonal növényei üvegházi környezetben az aG6 vonalhoz hasonlóan

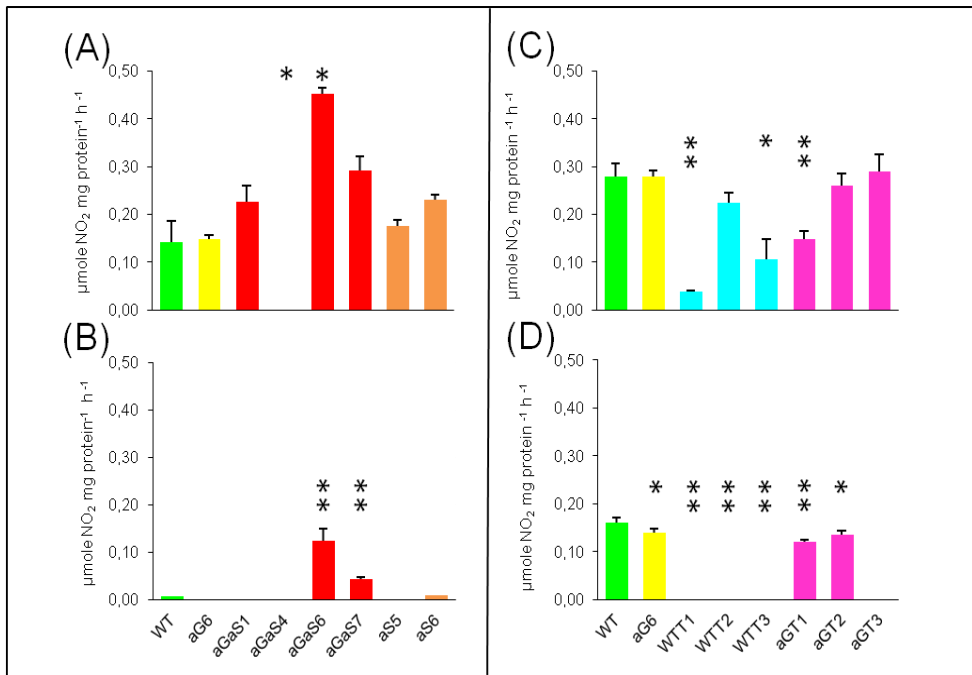
viselkedtek, mind fenotípus-, mind pedig gumóhozam tekintetében. Az aGT3 növényvonal a korai szenescencia jeleit mutatta.

A transzgenikus burgonyanövények nitrát-reduktáz aktivitása

A élesztő GAL83 növényi ortológjai képesek kölcsönhatásba lépni a nitrát-reduktázzal (NR) és negatívan befolyásolni annak aktivitását (POLGE et al. 2008; LI et al. 2009). Ez a tény arra sarkallt minket, hogy megvizsgáljuk transzgenikus növényeink NR aktivitását. Először az aG, aS és aGaS vonalainkban mértünk NR aktivitást üvegházi növények asszimiláló leveleiből. Mivel a NR enzim aktivitása nappal magas és éjjel alacsony (STITT et al., 2002), mintáinkat négy órával napkelte után és négy órával napnyugta után gyűjtöttük (5. ábra).

Ahogy az az 5. ábra „A” részén látható, az NR-aktivitás nappal az aGaS6 és aGaS7 vonalakban volt a legnagyobb. Nem mutattunk ki szignifikáns különbséget a WT, aG6, aS5 és aS6 vonalak között. A legalacsonyabb aktivitással az aGaS4 vonal rendelkezett, melyben sem nappal, sem pedig éjszaka nem tudtunk értékelhető aktivitást detektálni (5. ábra A,B). A sötétség minden vonal NR aktivitását jelentősen csökkentette, azonban az aGaS6 és aGaS7 vonalakban éjszaka is számottevő enzimaktivitást mértünk a többi vonallal összehasonlítva (5. ábra B).

Az StubGAL83 antiszensz gátlása jelentősen csökkentette a *TPS1* gén kifejeződése következtében kialakuló fenotípusos rendellenességeket. Megvizsgáltuk a WTT és aGT növényeink NR aktivitását is. Az 5. ábra „C” részén látható, hogy a NR aktivitás tekintetében jelentős csökkenés következett be nappal a WTT1, WTT3 és aGT1 vonal esetében, ugyanakkor ezt nem tapasztaltuk a WTT2, aGT2 és aGT3 növényeknél. Éjszaka nem lehetett NR aktivitást kimutatni a WTT vonalak és az aGT3 növények esetében, ugyanakkor az aGT1 és aGT2 növények aktivitás értéke a kontroll növényekéhez hasonló volt. A NR teljes napi aktivitásának tekintetében a *TPS1* kifejező növények közül az aGT1 és aGT2 vonal mutatta a kontroll növényekéhez leginkább hasonló értéket.



5. ábra. Üvegházban nevelt növények nitrát-reduktáz aktivitása. (A) aS, aGaS, aG növények nappali aktivitásértéke a vad típusal összevetve, (B) aS, aGaS, aG növények éjszakai NR aktivitása a vad típushoz képest, (C) WTT és aGT növények nappali NR aktivitása a kontroll növényeikkel összehasonlítva, (D) WTT és aGT vonalak éjszaka mért NR aktivitása a kontroll növényekhez képest. Az A és B kísérletsorozatot más évszakban végeztük, mint a C és B részben bemutatott kísérleteket. (Az egy csillag 95%-os-, a két csillag pedig 99%-os valószínűségű, jelentős eltérést jelez a vad típushoz képest *t*-teszt alapján.).

Új tudományos eredmények

1. Igazoltuk, hogy az StubSNF1 antiszensz gátlása a burgonyanövényben fenotípusos károsodáshoz vezet. A módosított növények sótűrő képessége és termőképessége csökken, amelyet gyakran a gumók megváltozott színe és morfológiája kísér.

2. Létrehoztunk és jellemeztünk StubGAL83-StubSNF1 kettős antiszensz (aGaS) burgonyanövényeket StubGAL83-gátolt vonalak antiszensz *StubSNF1* konstrukcióval történő felültranszformálásával. Kimutattuk, hogy ez a típusú módosítás üvegházi körülmények között a vad típusnál erőteljesebb fenotípusú és annál nagyobb termőképességű növények létrejöttéhez is vezethet. Ezek a nagy termőképességű burgonyavonalak viszont jelentősen kisebb sótűréssel rendelkeznek, mint a nem transzformált kontroll növények.

3. Vad típusú, valamint StubSNF1- és StubGAL83-gátolt növényekben juttattuk kifejezésre az élesztő *TPS1* génjét. Igazoltuk, hogy az StubSNF1 gátlása nem tudja megakadályozni a *TPS1* kifejeződés okozta fenotípusos károsodás létrejöttét, míg az StubGAL83 gátlása képes csillapítani azt.

4. Bebizonyítottuk, hogy az aGaS növények erőteljesebb növekedésének és emelkedett termőképességének-, valamint a *TPS1* kifejeződés okozta károsodások csillapításának hátterében a nitrát-reduktáz aktivitás növekedése áll.

Következtetések és javaslatok

Az SnRK1 fehérjék az egyedfejlődés és az anyagcsere folyamatok központi szabályozó molekulái növényekben (COELLO et al., 2011). Az AKIN10 nevű katalitikus SnRK1 alegységet túltermelő *Arabidopsis* modellnövényben a keményítő és oldható cukrok koncentrációja megváltozik. Számos esszenciális enzim aktivitása módosul, pl., a NR és az ADP-glükóz pirofoszforiláz (AGPáz) fehérjéké, de emellett több cukorszint-szabályozta gén kifejeződése is megváltozik (JOSSIER et al., 2009). Az AKIN10 túltermeltetése gátolja az embrió-vegetatív-, valamint a vegetatív-reproduktív fázisátmenetet *Arabidopsis*-ban és több szerv fejlődését is módosítja (TSAI és GAZZARRINI, 2012). Burgonyában az SNF1 aktivitás gumó-specifikus gátlása csökkenti a szacharóz-szintáz kifejeződését és megváltoztatja az AGPáz enzim redox aktivációját a gumóban (PURCELL et al., 1998; TIESSSEN et al., 2003). Kísérleteinkkel igazoltuk, hogy az StubSNF1 komplex katalitikus alegységének folyamatos gátlása fejlődési rendellenességekhez és gumóhozam csökkenéshez vezet. Eredményeink tehát újabb bizonyítékot szolgáltatnak arra, hogy az SnRK1 fehérjék kulcsfontosságú szerepet játszanak a növények fejlődésében.

Két *SnRK1* gént azonosítottak eddig a burgonyában: a *PKIN1*-et és az *StubSNF1*-et (MAN et al., 1997; LAKATOS és BÁNFALVI, 1997). BECZNER et al. (2010) igazolta az antiszensz gátlás specifikusságát az antiszensz StubSNF1 (aS) és az antiszensz PKIN1 (aP) vonalakban, melyek az említett fehérjék szekvenciájának nem konzerválódott regulátor alegységére tervezett antiszensz konstrukcióival lettek létrehozva. Növényekben az SNF1 aktivitás mérésére szolgáló SAMS peptid használatával BECZNER et al. (2010) 25-50%-os aktivitás csökkenést mért az aP és az aS vonalakban a vad típushoz képest. Megmértük az aG6 vonal SNF1 aktivitását és a kontroll növényekhez képest 42%-os csökkenést detektáltunk. Ez arra utal, hogy az StubGAL83 az StubSNF1 kináz pozitív regulátora. Ugyanez az eredmény vonható le a sótesztek értékelése után is, amelyek fokozott sóérzékenységet mutattak az aG és aS növények esetében is. A só gyökerezést gátló hatása az aS növények esetében azonban erősebb volt, mint az aG vonalakban. Az StubGAL83-, valamint az StubSNF1 gátlása egyaránt befolyásolta a növények gumófejlődését. Míg azonban az aG vonaloknál csak az átlagos gumóméret csökkenését és a gumószám növekedését tapasztaltuk a gumóképzés késése mellett, addig az aS növényeknél a genetikai módosítás a gumóhozam csökkenését és a gumók fenotípusos változását is maga után vonta. (LOVAS et al., 2003a; Fig. 1).

Az aGaS növények létrehozásához az aG1, aG5 és aG6 vonalakat felültranszformáltuk az *StubSNF1*-specifikus antiszensz konstrukcióval. A kapott aGaS növények három kategóriába sorolódtak: (1) lassabban fejlődő és megváltozott levélmorfológiájú vonalak, melyek kevés számú gumót képeztek, vagy pedig egyáltalán nem kötöttek gumót; (2) vad típushoz hasonló növények; és (3) a kontroll növényekhez képest gyorsabban és magasabbra növő burgonyavonalak, melyek nagyobb termőképességgel is rendelkeztek. Az aGaS vonalak esetében négy alacsony és tíz magas gumóhozamú vonalnál vizsgáltuk meg az *StubSNF1* kifejeződésének mértékét. RNS szinten egyedül az aGaS6 vonalnál tudtunk kimutatni némi csökkenést az aG és a vad típusú növényekkel összehasonlítva. Ezzel szemben korábban, az aS vonaloknál, az *StubSNF1* mRNS szintje detektálható mértékben csökkent (SÓS-HEGEDŰS et al., 2005), pedig ezeket a vonalakat ugyanazzal az *StubSNF1* szakasszal hozták létre, mint mi az aGaS növényeket. Figyelembe véve az SnRK1 fehérjéknek a növényi fejlődésben játszott kulcsszerepét, illetve azt a tényt, hogy az aG vonalak esetén már jelentős mértékben csökkent az SNF1 aktivitás, úgy gondoljuk, hogy az SNF1 aktivitás további jelentős csökkenése már halálos lehet a növények számára. Ez azonban nem zárja ki azt, hogy az aGaS vonalakban az *StubSNF1* mRNS szintjében kis különbségek ne lehetnének, de ezek kimutatásához a northern hibridizáció nem volt elég érzékeny. BRODERSEN et al. (2008) eredményei alapján azonban azt is elképzelhetőnek tartjuk, hogy egyes aGaS vonalakban nem transzkripció, hanem transláció szintű gátlás alakult ki. A különböző aGaS növényekben a géncsendesítés különböző módok jöhetett létre, ami magyarázatként szolgálhat az aGaS vonalak esetében tapasztalt eltérő fenotípusokra.

Az mRNS szinten jelentős változást nem mutató aGaS vonalak esetében az SNF1 aktivitás szintjén sem tudtunk további csökkenést kimutatni az aG6 vonalhoz képest, kivéve az aGaS6 vonalat, amiben az SNF1-aktivitás értéke mindössze 36%-a volt a vad típusénak. A SAMS peptid sajnos nem kizárólagos szubsztrátja az *StubSNF1* kináznak, hanem méri a PKIN1 aktivitását is (BECZNER et al., 2010). Az *StubSNF1* és a PKIN1 funkciója viszont feltételezhetően eltérő (LOVAS et al. 2003b), így valószínű, hogy a PKIN1 nem képes maradéktalanul helyettesíteni az *StubSNF1*-et, ami a kapott fenotípusos és gumóhozam eltérésekhez vezethetett.

A legfontosabb kérdés azonban az, hogy az *StubGAL83* antiszensz gátlása hogyan képes csillapítani az élesztő *TPS1* kifejeződése okozta károsodásokat, és mi áll a háttérben a számos aGaS vonalnál tapasztalt termőképesség növekedésnek. Ismert, hogy az élesztő GAL83 *Arabidopsis* ortológjai képesek kölcsönhatásba lépni a nitrát-reduktázzal (NR) és negatívan szabályozzák annak aktivitását (POLGE et al., 2008; LI et al., 2009). Korábban kimutatták, hogy az SNF1

komplex katalitikus alegysége foszforiláció útján inaktiválja az NR enzimet (SUGDEN et al., 1999). Bár az StubSNF1 mRNS szintje nem emelkedik meg az éjjeli órákban (LOVAS A., nem közölt eredmény) az StubGAL83 kifejeződése éjszaka aktiválódik (LOVAS et al., 2003a). Ezért úgy gondoljuk, hogy az SNF1 kináz aktivitása a vad típusú növényekben éjszaka magasabb, mint nappal. A NR aktivitása ezzel ellentétes: nappal magas és éjszaka alacsony (5. ábra). Úgy véljük, hogy az StubSNF1 gátlása azokban a vonalakban volt erősebb, melyekben az NR aktivitás értéke relatíve magas maradt az éjszaka folyamán is. A magas NR aktivitásnak köszönhetően ezek a növények gyorsabban nőnek és magasabb termőképességet mutatnak, mint a kontroll növények. Az SnRK1-ek foszforilálják és inaktiválják a szacharóz-foszfát szintázt (SUGDEN et al., 1999) és szabályozzák az AGPáz (TIESSEN et al., 2003). Korábban kimutattuk, hogy burgonyában a piruvát kináz napi aktivitása megváltozik az aS vonalakban (BECZNER et al., 2010). Ily módon a szénhidrát anyagcserében létrejövő változások szintén hozzájárulhatnak az aGaS növények megváltozott fenotípusához.

A fenotípusosan károsodott WTT növények napi NR aktivitása csökkent, ugyanakkor a fenotípusában nem változott aGT vonalak NR aktivitás értéke a kontroll növényekéhez hasonlított. A WTT növények NR aktivitásának drasztikus csökkenése különösen éjszaka volt szembetűnő. Ebből arra következtetünk, hogy a *TPS1* kifejeződése erősíti az StubSNF1 kináznak a NR-ra gyakorolt gátló hatását. Az StubGAL83 antiszensz gátlása csillapította a *TPS1* kifejeződése következtében létrejövő károsodásokat, ami magasabb NR aktivitást és a vad típushoz hasonló fenotípust eredményezett.

A vad típusú növényekben kifejezésre juttatott *TPS1* transzgen még alacsony mRNS szint esetén is fokozta a szárazságtűrő képességet, ugyanakkor ezek a növények lassabban nőttek és alacsonyabb CO₂ fixációs rátával bírtak, mint a vad típus (STILLER et al., 2008). Az aGT növényvonalak szárazságtűrő képességét levett levél tesztben vizsgáltuk meg, de meg kellett állapítanunk, hogy az aGT növények szárazságtűrő képessége nem jobb, mint a nem transzformált kontroll növényeké. Így tehát valószínű, hogy a *TPS1* által kiváltott morfológiai változások nélkülözhetetlenek a fokozott szárazságtűrő képesség kialakulásához burgonyában.

Irodalomjegyzék

BECZNER, F., DANCS, G., SÓS-HEGEDŰS, A., ANTAL, F., BÁNFALVI, Z. (2010): *J Plant Physiol.*, 167, 1046-1051. p.

BRADFORD, M.M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72, 248-254. p.

BRODERSEN, P., SAKVARELIDZE-ACHARD, L., BRUUN-RASMUSSEN, M., DUNOYER, P., YAMAMOTO, Y.Y., SIEBURTH, L., VOINNET, O. (2008): Widespread Translational Inhibition by Plant miRNAs and siRNAs. *Science*, 320, 1185-1190 p.

COELLO, P., HEY, S.J., HALFORD, N.G. (2011): The sucrose non-fermenting-1-related (SnRK) family of protein kinases: potential for manipulation to improve stress tolerance and increase yield. *J. Exp. Bot.*, 62, 883-893. p.

DELATTE, T.L., SEDIJANI, P., KONDOU, Y., MATSUI, M., DE JONG, G.J., SOMSEN, G.W., WIESE-KLINKENBERG, A., PRIMAVESI, L.F., PAUL, M.J., SCHLUEPMANN, H. (2011): Growth arrest by trehalose-6-phosphate: an astonishing case of primary metabolite control over growth by way of the SnRK1 signaling pathway. *Plant Physiol.*, 157, 160-174. p.

FERNANDEZ, O., BÉTHENCOURT, L., QUERO, A., SANGWAN, R.S., CLÉMENT, C. (2010): Trehalose and plant stress responses: friend or foe? *Trends Plant Sci.*, 7, 409-417. p.

HAGEMAN, R.H., HUCKLESBY, D.P. (1971): Nitrate reductase from higher plants. *Methods Enzymol.*, 23, 491-503. p.

HARRIS, N., FOSTER, J.M., KUMAR, A., DAVIES, H.V., GEBHARDT, C., WRAY, J.L. (2000): Two cDNAs representing alleles of the nitrate reductase gene of potato (*Solanum tuberosum* L. cv. Désirée): sequence analysis, genomic organization and expression. *J. Exp. Bot.*, 347, 1017-26. p.

HEDBACKER, K., CARLSON, M. (2008): SNF1/AMPK pathways in yeast. *Front. Biosci.*, 13, 2408-2420. p.

JOSSIER, M., BOULY, J.P., MEIMOUN, P., ARJMAND, A., LESSARD, P., HAWLEY, S., HARDIE, D.G., THOMAS, M. (2009): SnRK1 (SNF1-related kinase 1) has a central role in sugar and ABA signalling in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.*, 59, 316-328. p.

LAKATOS, L., BÁNFALVI, Z. (1997): Nucleotide sequence of a cDNA clone encoding an SNF1 protein kinase homologue (Accession No. U83797): from *Solanum tuberosum* (PGR97-043). *Plant Physiol.*, 113, 1004. p.

LAKATOS, L., KLEIN, M., HOFGEN, R., BÁNFALVI, Z. (1999): Potato StubSNF1 interacts with StubGAL83: a plant protein kinase complex with yeast and mammalian counterparts. *Plant J.*, 17, 569-574. p.

LI, X.F., LI, Y.J., AN, Y.H., XIONG, L.J., SHAO, X.H., WANG, Y., SUN, Y. (2009): AKINbeta1 is involved in the regulation of nitrogen metabolism and sugar signaling in *Arabidopsis*. *J. Integr. Plant Biol.*, 51, 513-520. p.

LOVAS, A., BIMBÓ, A., SZABÓ, L., BÁNFALVI, Z. (2003a): Antisense repression of StubGAL83 affects root and tuber development in potato. *Plant J.*, 33, 139-147. p.

LOVAS, A., SÓS-HEGEDŰS, A., BIMBÓ, A., BÁNFALVI, Z. (2003b): Functional diversity of potato SNF1-related kinases tested in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, 321, 123-129. p.

MAN, A.L., PURCELL, P.C., HANNAPPEL, U., HALFORD, N.G. (1997): Potato SNF1-related protein kinase: molecular cloning, expression analysis and peptid kinase activity measurements. *Plant Mol. Biol.*, 34, 31-43. p.

MARTÍNEZ-BARAJAS, E., DELATTE, T., SCHLUEPMANN, H., DE JONG, G.J., SOMSEN, G.W., NUNES, C., PRIMAVESI, L.F., COELLO, P., MITCHELL, R.A.C., PAUL, M.J. (2011): Wheat grain development is characterized by remarkable trehalose-6-phosphate accumulation pregrain filling: tissue distribution and relationship to SNF1-related protein kinase1 activity. *Plant Physiol.*, 156, 373-381. p.

POLGE, C., JOSSIER, M., CROZET, P., GISSOT, L., THOMAS, M. (2008): Beta-subunits of the SnRK1 complexes share a common ancestral function together with expression and function specificities; physical interaction with nitrate reductase specifically occurs via AKINbeta1-subunit. *Plant Physiol.*, 148, 1570-1582. p.

PURCELL, P.C., SMITH, A.M., HALFORD, N.G. (1998): Antisense expression of a sucrose non-fermenting-1-related protein kinase sequence in potato results in decreased expression of sucrose synthase in tubers and loss of sucrose-inducibility of sucrose synthase transcripts in leaves. *Plant J.*, 14, 195-202. p.

SAMBROOK, J., FRITCH, E.F., MANIATIS, T. (1989): *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

SÓS-HEGEDŰS, A., LOVAS, A., KONDRÁK, M., KOVÁCS, G., BÁNFALVI, Z. (2005): Active RNA silencing at low temperature indicates distinct pathways for antisense-mediated gene-silencing in potato. *Plant Mol. Biol.*, 59, 595-602. p.

STILLER, I., DULAI, S., KONDRÁK, M., TARNAI, R., SZABÓ, L., TOLDI, O., BÁNFALVI, Z. (2008): Effects of drought on water content and photosynthetic parameters in potato plants expressing the trehalose-6-phosphate synthase gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Planta*, 227, 299-308. p.

STITT, M., MÜLLER, C., MATT, P., GIBON, Y., CARILLO, P., MORCUENDE, R., SCHEIBLE, W.R., KRAPP, A. (2002): Steps towards an integrated view of nitrogen metabolism. *J. Exp. Bot.* 53, 959-970. p.

SUDGEN, C., DONAGHY, P., HALFORD, N.G., HARDIE, D.G. (1999): Two SNF1-related protein kinases from spinach leaf phosphorylate and inactivate 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase, nitrate reductase and sucrose phosphate synthase in vitro. *Plant Physiol.*, 120, 257-274. p

TIESSEN, A., PRESCHA, K., BRANSCHIED, A., PALACIOS, N., MCKIBBIN, R., HALFORD, N.G., GEIGENBERGER, P. (2003): Evidence that SNF1-related kinase and hexokinase are involved in separate sugar signalling pathways modulating post-translational redox activation of ADP-glucose pyrophosphorylase in potato tubers. *Plant J.*, 35, 490-500. p.

TSAI, A.Y., GAZZARRINI, S. (2012): AKIN10 and FUSCA3 interact to control lateral organ development and phase transitions in Arabidopsis. *Plant J.*, 69, 809-821. p.

ZHANG, Y., PRIMAVESI, L.F., JHURREEA, D., ANDRALOJC, P.J., MITCHELL, R.A.C., POWERS, S.J., SCHLUEPMANN, H., DELATTE, T., WINGLER, A., PAUL, M.J. (2009): Inhibition of SNF1-related protein kinase1 activity and regulation of metabolic pathways by trehalose-6-phosphate. *Plant Physiol.*, 149, 1860-1871. p.

Saját közlemények

Szakkikkek folyóiratokban

ANTAL, F., KONDRÁK, M., KOVÁCS, G., BÁNFALVI, Z. (2012): Influence of the StubSNF1 kinase complex and the expression of the yeast *TPS1* gene on growth and tuber yield in potato. *Plant Growth Regul.* – DOI: 10.1007/s10725-012-9746-7 IF: 1.604

KONDRÁK, M., MARINCS, F., **ANTAL, F.**, JUHÁSZ, Z., BÁNFALVI, Z. (2012): Effects of yeast trehalose-6-phosphate synthase 1 on gene expression and carbohydrate contents of potato leaves under drought stress conditions. *BMC Plant Biol.*, 12, 74. p. IF: 3.45

BEZNER, F., DANCS, G., SÓS-HEGEDŰS, A., **ANTAL, F.**, BÁNFALVI, Z. (2010): Interaction between SNF1-related kinases and a cytosolic pyruvate kinase of potato. *J. Plant Physiol.* 167, 1046-1051. p. IF: 2.677

BEZNER, F., **ANTAL, F.**, BÁNFALVI, ZS (2010): A burgonya Y vírus HC-Pro és a burgonya StubGAL83 fehérjéjének kapcsolata. *Növényvédelem*, 46, 226-232. o.

ANTAL, F., BÁNFALVI, ZS. (2010): Genetikailag módosított burgonyafajták. *Agrofórum* 21, 110-111. o.

Szakmai előadások

ANTAL, F., BEZNER, F., STILLER, I., NYIKÓ, T., SILHAVY, D., PALKOVICS, L., BÁNFALVI, ZS. (2011): Új elem a vírusok és növények párharcában: A PVY HC-PRO és a burgonya StubGAL83 fehérjéjének kapcsolata. XVII. Növénynevelési Tudományos Napok, Budapest, 2011. április 27. Összefoglaló 50. o.

BEZNER, F., **ANTAL, F.**, STILLER, I., BÁNFALVI, ZS. (2009): Az SNF1 protein-kináz kapcsolata a burgonya Y vírus HC-Pro fehérjéjével burgonyában. MBK-Napok, Gödöllő, 2009. november 30-december 1.

ANTAL, F. (2008): Molekuláris nemesítéssel létrehozott magas terméshozamú burgonya. Fiatal kutatók az élhető Földért - MTA Magyar Tudomány Ünnepe, FVM központi rendezvény, Budapest, 2008. november 24.

ANTAL, F., DANCS, G., BECZNER, F., KOVÁCS, G., BÁNFALVI, ZS. (2006) Befolyásolja-e az StubSNF1 komplex aktivitása a burgonya TPS1 expresszió alapuló szárazságtűrését? MBK Napok, Gödöllő, 2006. november 27- 28.

Konferencia összefoglalók (posztterek)

SÓS-HEGEDŰS, A., JUHÁSZ, Z., ANTAL, F., KONDRÁK, M., MAUCH-MANI, B., BÁNFALVI, Z. (2012): 9th Solanaceae Conference, Neuchatel, Switzerland, 2012. augusztus 26-30., Abstract 185. p.

ANTAL, F., BECZNER, F., STILLER, I., NYIKÓ, T., SILHAVY, D., PALKOVICS, L., BÁNFALVI, Z. (2012): A new element in the fight between plants and viruses: The HC-Pro protein of PVY inhibits the StubSNF1 kinase complex in potato. PPBA workshop, Debrecen, p. 30.

KONDRÁK, M., MARINCS, F., ANTAL, F., JUHÁSZ, Z., BÁNFALVI, Z. (2012): Transcriptional and metabolic changes elicited by drought stress in *TPS1*-expressing potato leaves. PPBA workshop, Debrecen, p. 47.

ANTAL, F., KONDRÁK, M., KOVÁCS, G., BÁNFALVI, ZS. (2012): Magas terméshozamú burgonyavonalak létrehozása molekuláris nemesítéssel. XVIII. Növénynemesítési Tudományos Napok, Budapest, 2012. március 6., Összef.55. o.

ANTAL, F., DANCS, G., BECZNER, F., KOVÁCS, G., BÁNFALVI, ZS. (2007): A *TPS1* expresszió alapuló szárazságtűrés és az StubSNF1 komplex működése közötti kapcsolat vizsgálata burgonyában. XIII. Növénynemesítési Tudományos Napok, Budapest, 2007. március 12. Összefoglaló 104. o.

A doktori értekezés témájához nem kapcsolódó konferencia összefoglaló

ANTAL, F., HORVÁTH, GY., MÁTICS, R., PUTNOKY, P. (2005): Az északi pocok mtDNS kontroll régiójának elemzése. V. Magyar Genetikai Kongresszus XIII. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok, Eger, 2005. április 10-12. Összefoglaló 115. o.